

## **Опыт применения докозагексаеновой кислоты (БрудиПлюс) у пациентов с повышенным индексом фрагментации ДНК сперматозоидов в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова**

**А.Ю. Попова<sup>1,2</sup>, С.И. Гамидов<sup>1,2</sup>, Р.И. Овчинников<sup>1</sup>, И.В. Ушакова<sup>1</sup>, О.Н. Голубева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Отделение андрологии и урологии ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. академика Опарина, 4;

<sup>2</sup> кафедра акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. академика Опарина, 4

**Контакты:** Алина Юрьевна Попова [alina-dock@ya.ru](mailto:alina-dock@ya.ru)

*Почти в половине браков причиной бесплодия является мужской фактор. У бесплодных мужчин доля сперматозоидов с нарушением целостности ДНК более 30 %, при этом у здоровых фертильных мужчин — менее 15 %. С распространением вспомогательных репродуктивных технологий растет осознание важности повреждения ДНК спермы. На сегодняшний день эти последствия еще не изучены, а имеющийся терапевтический эффект от приема антиоксидантов не имеет прямой корреляции с уровнем фрагментации ДНК спермы. Докозагексаеновая кислота относится к наиболее ценным для здоровья человека полиненасыщенным жирным кислотам омега-3. Докозагексаеновая кислота — главный компонент серого вещества мозга, сетчатки глаза, яичек, спермы и клеточных мембран. В связи с этим было проведено исследование, целью которого явилась оценка влияния нутрицевтической энзиматической докозагексаеновой кислоты триглицерида (БрудиПлюс) в высокой концентрации на поврежденную ДНК сперматозоидов у пациентов с патозооспермией. В данное исследование были включены 40 больных с идиопатической патозооспермией и с уровнем фрагментации ДНК, который превышал нормативные значения. Были получены положительные результаты: прием БрудиПлюс позволяет снизить уровень повреждения ДНК сперматозоидов, а также улучшить антиоксидантную систему спермы.*

**Ключевые слова:** мужское бесплодие, фрагментации ДНК спермы, докозагексаеновая кислота, спермограмма, лечение бесплодия, индекс фрагментации, астенозооспермия, астенотератозооспермия, тератозооспермия, олигоастенозооспермия, олигоастенотератозооспермия

### **Experience in the use of docosahexaenoic acid (BrudiPlus) in patients with increased sperm DNA fragmentation index in Acad. V.I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology**

**A. Yu. Popova<sup>1,2</sup>, S. I. Gamidov<sup>1,2</sup>, R. I. Ovchinnikov<sup>1</sup>, I. V. Ushakova<sup>1</sup>, O. N. Golubeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Urology and Andrology, Acad. V.I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Health of Russia; 4 akademika Oparina St., Moscow, 117997, Russia;

<sup>2</sup> Department of Obstetrics, Gynecology, Perinatology and Reproductology, Faculty of Postgraduate Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; 4 akademika Oparina St., Moscow, 117997, Russia

*Male factor is the reason of infertility in almost half of marriages. Infertile men have the percentage of sperm with violations of DNA integrity of over 30 %; with that, healthy fertile men have that indicator of less than 15 %. Understanding of importance of damages of sperm DNA is growing with distribution of auxiliary reproductive technologies. As of today, these consequences have not been studied yet, and the therapeutic effect of intake of antioxidants has not direct correlation with the sperm DNA fragmentation level. Docosahexaenoic acid is one of the most valuable omega-3 polyunsaturated fatty acids for human health. Docosahexaenoic acid is the main component of the brain gray matter, retina, testes, and sperm cell membranes. In connection with that, a study was held the purpose of which was to assess the effect of the nutraceutical enzymatic docosahexaenoic acid triglyceride (BrudiPlus) in high concentrations on damaged sperm DNA of patients with idiopathic pathozoospermia. 40 patients with idiopathic pathozoospermia and the level of DNA fragmentation over the statutory value took part in this study. The following positive results were received: intake of BrudiPlus allowed decreasing sperm DNA damages and improving of antioxidant system of sperm.*

**Key words:** male infertility, sperm DNA fragmentation, docosahexaenoic acid, spermogram, infertility treatment, fragmentation index, asthenozoospermia, asthenoteratozoospermia, teratozoospermia, oligoasthenozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia

### Введение

В настоящее время мужской фактор является причиной бесплодия в браке почти в половине случаев, как изолированно, так и сочетанно (Европейская ассоциация урологов, 2014). Актуальность мужского бесплодия не вызывает сомнений, а методы его диагностики и лечения остаются не до конца изученными. Сегодня спермограмма (микроскопическое исследование качества спермы) представляет собой самый простой вид исследования сперматозоидов, но, к сожалению, дает неполную информацию о возможных нарушениях сперматогенеза [1]. Все большее число исследований, опубликованных в международной и отечественной литературе, указывает на то, что доля сперматозоидов с хромосомными нарушениями наследственного материала очень важна, с одной стороны, для способности к оплодотворению, а с другой — для определения риска репродуктивных потерь [2]. Однако показатель генетической целостности сперматозоида — индекс фрагментации (ИФ) — нельзя определить с помощью обычной спермограммы.

Фрагментация ДНК сперматозоидов — относительно недавно открытая, интенсивно исследуемая в последнее десятилетие причина мужского бесплодия и отцовского эффекта нарушений раннего эмбрионального развития [3]. Основными факторами разрывов ДНК считают процессы изменения структуры хроматина в ходе сперматогенеза и апоптоза. Апоптоз — программируемая гибель клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации (уплотнении) и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматической мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Для оценки фрагментации ДНК и апоптотических маркеров сперматозоидов в настоящее время разработан целый ряд методических подходов [4]. Высокий процент сперматозоидов с повреждениями ДНК не всегда коррелирует с обычными параметрами спермограммы. В то же время фрагментация ДНК сперматозоидов может оказывать влияние на ранние этапы эмбрионального развития, особенно на формирование бластоцисты и частоту наступления беременности в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) [5]. Начинают разрабатываться подходы к преодолению повышенной фрагментации в сперматозоидах человека. В последнее время в спермиологических лабораториях чаще всего используют методы анализа фрагментации ДНК в клетках и в ткани, такие как выявление апоптотических клеток (transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) и конечной маркировки (*in situ* end-labeling, ISEL). Данные подходы позволяют выявить изменения ДНК на самых ранних стадиях апоптоза, до того как появятся тельца апоптоза — фрагментированная ДНК в виде глыбок хроматина в ядре

или в цитоплазматических каплях вне клетки. Метод TUNEL, получивший наиболее широкое распространение, позволяет регистрировать нарушение целостности ДНК сперматозоидов, которое связано с упаковкой патологического хроматина или дефицитом протамина, оказывающее негативное влияние на репродуктивные исходы при естественном зачатии или в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

У бесплодных мужчин доля сперматозоидов с нарушением целостности ДНК  $\geq 30\%$ , при этом у здоровых фертильных мужчин  $\leq 15\%$ . При фрагментации ДНК спермы  $\geq 30\%$  вероятность наступления беременности крайне низкая [6]. С распространением ВРТ растет осознание важности повреждения ДНК спермы, но на сегодняшний день эти последствия еще в значительной степени неизвестны [7].

Выделяют следующие причины нарушения хроматина — повреждения ДНК сперматозоидов:

- первичные или внутренние дефекты сперматогенеза (аномалии развития или генетические дефекты);
- вторичные или внешние повреждения тестикул (гонадотоксины, гипертермия, оксидативный стресс, эндокринные заболевания).

У больных с идиопатическим бесплодием, у которых выявляется значимое увеличение количества сперматозоидов со сниженной степенью конденсации хроматина, наблюдаются дефицит протаминов, активные формы кислорода, нарушения апоптоза и замены гистонов на протамины в сперматиде, плохая упаковка хроматина, а также усиление чувствительности к оксидативному стрессу дефектных сперматозоидов [8]. Но немаловажной задачей для клиницистов является не только выявление нарушений, но также и лечение пациентов с повышенным ИФ ДНК спермы. Мы проанализировали работы зарубежных авторов, в которых продемонстрировано, что липидный состав клеточных мембран сперматозоидов существенно влияет на функциональные характеристики сперматозоидов [9]. Также были обнаружены длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) в высокой концентрации в сперматозоидах человека [10, 11], а их доля по отношению к насыщенным жирным кислотам и холестерину тесно связана с текучестью мембран сперматозоидов [12]. Благодаря большому количеству двойных связей ПНЖК в мембранах сперматозоидов особенно восприимчивы к перекисному разрушению [13]. Это имеет важное значение при криоконсервации, когда увеличивается общее количество образовавшихся активных соединений кислорода [14] и меняется антиоксидантная система [15–17]. Содержание ПНЖК, омега-3 и особенно докозагексаеновой кислоты положительно коррелирует с подвижностью и жизнеспособностью сперматозоидов после замораживания/размораживания, и это может означать,

что жирнокислотный состав может быть применен в качестве прогностического критерия антиоксидантного потенциала эякулята. Кроме того, методы изменения липидного состава сперматозоидов можно использовать как положительный антиоксидантный терапевтический эффект [18–20].

**Цель исследования** — оценка влияния энзиматической докозагексаеновой кислоты триглицерида (БрудиПлюс) в высокой концентрации на поврежденную ДНК сперматозоидов.

### **Материалы и методы**

В исследование были включены 40 больных с идиопатической патозооспермией и с уровнем фрагментацией ДНК, который превышал нормативные значения. ИФ ДНК спермы определяли с помощью метода TUNEL (норма до 15 %). Все пациенты дали согласие на участие в данной работе.

**Критерии включения:** возраст старше 18 лет, наличие патозооспермии, подтвержденной стандартной спермограммой, а также повышенной фрагментацией ДНК спермы, наличие информированного согласия.

**Критерии исключения:** повышение или снижение уровней лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тяжелые поражения сперматогенеза (криптозооспермия и некрозооспермия), наличие эндокринных и генетических нарушений, тяжелых соматических заболеваний, двустороннее поражение придатков и яичек воспалительного и травматического характера, варикоцеле.

Возраст пациентов, включенных в исследование, составил 22–48 лет (средний возраст  $30,2 \pm 6,6$  года). Кроме анализа жалоб, сбора анамнеза и физикального обследования, всем больным выполняли исследование спермограммы по стандартной методике, рекомендованной Всемирной организацией здравоохранения (2010 г.), определяли уровень половых гормонов крови, ингибина В, выполняли ультразвуковое исследование (УЗИ) и доплерографию сосудов органов мошонки, генетические исследования (кариотип, фактор азооспермии, ген муковисцидоза). Также у всех пациентов определяли уровень фрагментации ДНК методом TUNEL. Оценку процента сперматозоидов с фрагментацией ДНК производили с помощью набора реактивов фирмы Millipore (США) Apor Tag In Situ Apoptosis Detection Kits. На предметное стекло, покрытое Polysine (Thermo), наносили препарат сперматозоидов, отмытых от спермальной жидкости. Препарат высушивали в 1 % растворе параформальдегида в течение 10 мин. Дважды промывали в фосфатном буфере и помещали в раствор этанолуксусной кислоты (2:1) на 5 мин при 20 °С. Затем дважды промывали в фосфатном буфере. На препарат наносили раствор фермента TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) (период инкубации 60 мин), а затем раствор anty-digoxigenin

conjugate, содержащий флуоресцентный краситель (родамин), и инкубировали 30 мин. Дважды промывали в фосфатном буфере и инкубировали в растворе ядерного флуоресцентного красителя DAPI в течение 5 мин. Затем препарат 4 раза промывали в фосфатном буфере и помещали под покровное стекло. Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus с 2 фильтрами длиной волны 350 и 560 нм. Препарат просматривали в нескольких полях зрения и оценивали 1000 клеток. Полученные изображения анализировали в программе Imadge Pro для подсчета количества ядер сперматозоидов с фрагментацией ДНК и общего количества неповрежденных ядер. Подсчитывали процент (среднее значение) фрагментированных ядер в препарате данного пациента.

После комплексного андрологического обследования все пациенты с патозооспермией и повышенной фрагментацией ДНК спермы были разделены на 2 равнозначные группы. В 1-ю вошли 20 больных, которые получали БрудиПлюс (тридокозагексаеновая кислота триглицерида в высокой концентрации). Во 2-й группе были 20 пациентов, которым проводили стандартную антиоксидантную терапию. Всем пациентам повторили спермограмму и оценку фрагментации ДНК спермы (TUNEL) через 1,5 и 3 мес лечения.

Анализ клинических данных проводили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 10.0 и Statistica 7.0.

Для проверки статистических гипотез были использованы следующие методы: t-критерий Стьюдента (для анализа выборок с распределением, приближенным к нормальному) и точный критерий Фишера. Для всех критериев и тестов критический уровень значимости (если не оговорено иное) принимали равным 5 %, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,05$ .

### **Результаты**

Сбор анамнеза показал, что ни один из пациентов не подвергался воздействиям ионизирующего излучения, не употреблял наркотические средства, а также алкоголь. Некоторые пациенты (35,4 %) имели избыточную массу тела и ожирение разной степени выраженности (16,5 %), средний индекс массы тела в группе составил  $29,7 \pm 7$  кг/м<sup>2</sup>. С помощью имеющейся медицинской документации и сбора анамнеза выяснить этиологию патозооспермии у наших пациентов, к сожалению, не представлялось возможным. При осмотре у больных не наблюдались внешние признаки гипогонадизма. При пальпации органов мошонки отмечали нормальный объем яичек. По данным УЗИ предстательной железы у 62,7 % больных были выявлены ультразвуковые признаки хронического простатита. Результаты УЗИ органов мошонки патологических изменений не показали. При цветовом

доплеровском картировании сосудов органов мошонки патологический рефлюкс на высоте пробы Вальсальвы не зарегистрирован. При стандартном спермиологическом исследовании был поставлен диагноз патозооспермии. Причем 38 % больных имели астенозооспермию, 23 % — астенотератозооспермию, 9 % — тератозооспермию, 11 % — олигоастенозооспермию, 19 % — олигоастенотератозооспермию. По данным гормонального анализа крови изменения в средних показателях гормонов (ФСГ, ЛГ, тестостерона, пролактина) не отмечены. У всех пациентов был повышен уровень фрагментации ДНК (TUNEL) — 19,8–38,7 %. Средний уровень фрагментации ДНК в 1-й группе составил  $25,8 \pm 4,3$  %, а во 2-й —  $25,3 \pm 5,2$  %. При этом выраженность патозооспермии коррелировала с повышением ИФ ДНК спермы. Пациенты с олигоастенотератозооспермией имели уровень фрагментации ДНК  $38,5 \pm 5,6$  %, больные с астенозооспермией —  $22,3 \pm 4,5$  %, тератозооспермией —  $19,3 \pm 3,5$  % (рис. 1).

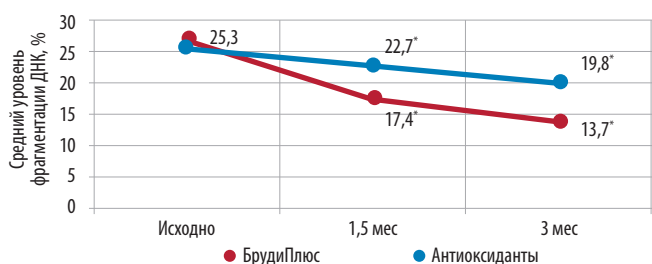


Рис. 1. Распределение по среднему уровню фрагментации ДНК спермы до лечения. \*  $p < 0,05$

Результаты анализа полученных данных после лечения показали высокую эффективность применения БрудиПлюс. У всех 20 пациентов 1-й группы отмечалось снижение уровня фрагментации ДНК спермы, тогда как во 2-й группе снижение было менее выраженным. Средний уровень фрагментации ДНК в 1-й группе составил 13,7 %, во 2-й — 19,8 % ( $p < 0,05$ ). Интересно, что снижение уровня фрагментации ДНК в 1-й группе было отмечено у 63 % больных уже после 1,5 мес лечения.

Также нами было выявлено увеличение подвижности сперматозоидов у пациентов, принимающих БрудиПлюс, которое составило 12–45 % от начала терапии (рис. 2).

### Обсуждение

Существует ряд доказательств того, что снижение уровня фрагментации ДНК спермы может происходить после коррекции этиологических причин, вызвавших нарушение ее целостности, например мероприятия по устранению варикоцеле (варикоцелеэктомия). Лечение инфекции с помощью антибиотиков также предполагает уменьшение фрагментации ДНК из-за снижения окислительного стресса.

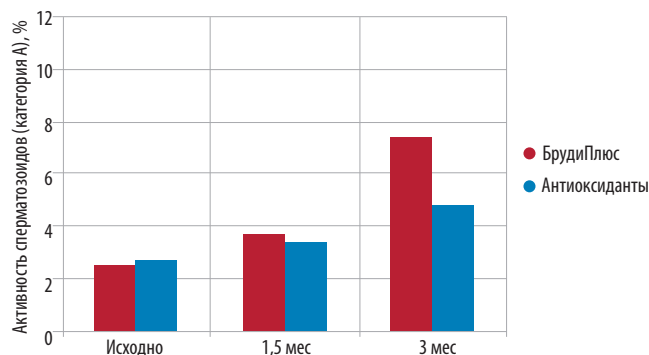


Рис. 2. Динамика активности сперматозоидов (категории А)

Полученные нами данные показывают, что некоторые причины фрагментации ДНК не могут быть диагностированы, но имеющийся ущерб от свободных радикалов может корректироваться с помощью изменения образа жизни, диеты, а также препаратов, предназначенных для защиты от окислительного стресса, которые помогают снизить уровень фрагментации ДНК в некоторых из этих случаев.

В нашей работе была продемонстрирована высокая эффективность БрудиПлюс у больных с идиопатической патозооспермией и повышенным уровнем фрагментации ДНК: 25,8 % против 13,7 % до и после лечения соответственно ( $p < 0,05$ ). Также было показано, что степень повреждения сперматогенеза может коррелировать с повышением значений фрагментации ДНК спермы. Пациенты с более выраженными нарушениями сперматогенеза имели уровень фрагментации ДНК  $38,5 \pm 5,6$  %. Такие данные мы встречаем в отечественной и зарубежной литературе. Однако данный факт требует дальнейшего исследования, так как нет четкой зависимости от уровня фрагментации ДНК с одним из показателей (концентрация, подвижность, морфология) спермограммы, нарушение целостности структуры ДНК спермы может встречаться у пациентов с нормальными показателями спермограммы.

Клиническое наблюдение, которое мы зафиксировали, показало, что положительное влияние БрудиПлюс в высокой концентрации отмечалось у 63 % больных уже после 1,5 мес терапии. Этот факт особенно важен при подготовке пациентов к программе ВРТ, когда время для терапии ограничено, а результативность программы ЭКО/ИКСИ может зависеть от уровня фрагментации ДНК [21].

### Заключение

На сегодняшний день наша работа — первый опыт использования БрудиПлюс у пациентов с идиопатической патозооспермией и нарушением целостности структуры ДНК сперматозоидов. В дальнейшем требуется исследование среди разных категорий больных,

а также получение результатов успеха беременности в бесплодных парах, которые применяют ту или иную терапию, направленную на снижение фрагментации ДНК спермы.

Следует отметить, что фрагментация ДНК спермы имеет не только диагностическое, но и практическое применение, особенно для супружеских пар, у которых есть субфертильные показатели спермограммы, и пар,

планирующих программу ВРТ. На сегодняшний день БрудиПлюс — единственный продукт с доказанной эффективностью применения пациентами с повышенной фрагментацией ДНК спермы. Исследования в этом направлении в будущем помогут клиницистам более эффективно влиять на нарушение структуры ДНК сперматозоидов, тем самым повышая фертилизацию и результативность различных методов достижения беременности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Guzik D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2004;345(19):1388–93.
2. Osman A., Alsomait H., Seshadri S. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;30(2):120–7.
3. Gandini L., Lombardo F., Paoli D. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15(4):830–9.
4. Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol* 2013; 927:147–64.
5. Kumar K., Deka D., Singh A. et al. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(9):861–7.
6. Spano M., Bonde J.P., Hjøllund H.I. The treatment of obstructive azoospermia by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2000;73(1):43–50.
7. Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Open Urol* 2006;16(6):428–34.
8. Zini A., Albert O., Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology* 2014;2(3):322–5.
9. Nogales-Gadea G., Pinós T., Ruiz J.R. Are mitochondrial haplogroups associated with elite athletic status? A study on a Spanish cohort. *Mitochondrion* 2011;11(6):905–8.
10. Ahluwalia B., Holman R.T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. *J Reprod Fertil* 1969;18(3):431–7.
11. Poulos A., White I.G. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1973;35(2):265–72.
12. Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 1996;2(3):246–56.
13. Alvarez J.G., Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995;42(3):334–46.
14. Wang A.W., Zhang H., Ikemoto I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997;49(6):921–5.
15. Alvarez J.G., Storey B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992;13(3): 232–41.
16. Lasso J.L., Noiles E.E., Alvarez J.G., Storey B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl* 1994;15(3): 255–65.
17. Gadea J., Molla M., Selles E. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011;62(1):40–6.
18. Agarwal A., Sekhon L.H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil (Camb)* 2010;13(4):217–25.
19. Safarinejad M.R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia* 2011;43(1):38–47.
20. Zini A., Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl* 2011;13(3):374–81.
21. Larson-Cook K.L., Brannian J.D., Hansen K.A. et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003;80(4):895–902.